

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА КАПСИДА ЦВС-2 ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

К.В. Кудин, В.А. Прокулевич

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

kiryl.kudin@gmail.com

Введение

Цирковирус свиней 2 типа (ЦВС-2) был идентифицирован более 15 лет назад как этиологический агент системного многофакторного заболевания свиней, называемого синдром мультисистемного истощения отъемышей [1]. По мере выяснения его роли в развитии других патологических состояний [2] вирус постепенно превратился в серьезную экономическую угрозу. Разработка методов борьбы с патогеном сопровождалась необходимостью появления средств диагностики и контроля цирковиральных инфекций. Долгое время круг доступных диагностических методик ограничивался непрямой иммунофлуоресцентным анализом и иммунопероксидазным окрашиванием [1, 3], которые сейчас успешно и интенсивно вытесняются более простыми, быстрыми и дешевыми методами иммуноферментного анализа (ИФА) [4, 5], чему способствует достаточно простая организация вируса [6]. Единственный структурный белок капсида, кодируемый геном ORF2 [7], одновременно является и его единственным антигеном [5]. Современные коммерческие иммуноферментные анализы для диагностики инфекций ЦВС-2 в большинстве своем используют рекомбинантный антиген ЦВС-2, который получают с помощью бакуловирусных или бактериальных систем экспрессии [5, 8, 9].

Представленная работа выполнялась в рамках проекта № 20113064 по заданию 4.2 МЦП ЕвразЭС, конечной целью которого является разработка иммуноферментного анализа с улучшенными характеристиками для диагностики цирковиральных инфекций в поголовье свиней Республики Беларусь. Поэтому задачи данного исследования включают разработку максимально простой, эффективной и экономически целесообразной технологии очистки рекомбинантного антигена ЦВС-2, позволяющей в конечном итоге получить препарат белка требуемого уровня качества для использования в виде основного компонента ИФА, а также проверку качества полученного антигена и исследование принципиальной возможности его использования в схеме ИФА.

Методы исследования

Конструкцию для экспрессии рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 в штаммах *E. coli* создали на основе вектора pET-24b (Merck KGaA).

Для продукции рекомбинантных белков использовали штамм *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (*E. coli* B F⁻ ompT hsdS(r_b⁻ m_b⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [argU proL Cam^r] [argU ileY leuW Strep/Spec^r]) фирмы Agilent Technologies.

Культивирование продуцента проводили в условиях 15-литрового ферментера фирмы Biotechno с программным обеспечением C-BIO (версия D) в автоиндукционной среде ZYM-20052 [10] в объеме 5 литров с добавлением сукцината натрия до концентрации 25 мМ, лактозы до 1% и глюкозы до 0,1% (вес/объем). Уровень растворенного кислорода поддерживали на уровне ≥50% от первоначального значения путем повышения давления в колбе ферментера (до 2 бар). Скорость воздушного потока через барботер оставалась постоянной на протяжении всего процесса культивирования (5 Нл/ч). Регулировку уровня pH в диапазоне 6,7–7,1 осуществляли с помощью 3 М фосфорной кислоты и 5 М гидроксида натрия. Процесс роста культуры оценивали турбидиметрически при длине волны 600 нм. Разведение образцов подбирали таким образом, измеряемое значение не превышало 0,4.

Для отделения клеток продуцента от культуральной жидкости использовали проточную центрифугу CEPA LE (Carl Padberg Zentrifugenbau GmbH) при ускорении 40000 g, скорость

потока культуры 5 л/ч. Осажденные клетки ресуспендировали в охлажденном до 4°C хроматографическом буферном растворе А (10 мМ имидазол, 300 мМ натрия хлорид, 20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор pH 7,4), содержащем смесь ингибиторов протеаз Pierce Protease Inhibitor Tablets (Thermo Fisher Scientific Inc.) без ЭДТА, ДНКазу I (10 мкг/мл) и РНКазу А (5 мкг/мл). Затем их разрушали при давлении 750–850 бар в гомогенизаторе высокого давления Panda PLUS (GEA Group AG). Грубый гомогенат осветляли центрифугированием с ускорением 10000 g в течение 40 мин при температуре 4°C. Супернатант после центрифугирования выдерживали при комнатной температуре 15 мин до полного ферментативного разрушения нуклеиновых кислот и снижения вязкости раствора, при необходимости разводили буферным раствором А и непосредственно использовали для хроматографии. Концентрацию общего белка в супернатанте определяли по методу Брэдфорда [11], разведение пробы подбирали таким образом, чтобы полученное значение оптической плотности находилось в пределах калибровочного диапазона. Для расчета основных физико-химических параметров рекомбинантного белка капсида (коэффициент экстинкции, молярная масса, изоэлектрическая точка) по его аминокислотной последовательности использовали программный инструмент ProtParam [12].

Пластиковую полипропиленовую хроматографическую колонку (рабочий объем 5 мл, внутренний диаметр 1 см) заполняли сорбентом HisPur Ni-NTA Superflow Agarose (Thermo Fisher Scientific Inc.), ограничив его пористыми полэтиленовыми дисками, при этом объем неподвижной фазы (сорбента) составил 1 мл. Для уравнивания колонки и нанесения образца использовали буферный раствор А (10 мМ имидазол, 300 мМ натрия хлорид, 20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор pH 7,4). После этапа нанесения сорбент промывали 5–7 объемами раствора А, а затем буферным раствором В (20 мМ имидазол, 300 мМ натрия хлорид, 20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор pH 7,4) до отсутствия сигнала на спектрофотометре ($\lambda=280$). Элюцию производили буфером С (300 мМ имидазол, 300 мМ натрия хлорид, 20 мМ натрий-фосфатный буферный раствор pH 7,4). Регенерацию сорбента проводили путем его промывания буферным раствором 20 мМ 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты pH 5,0 с добавлением натрия хлорида до концентрации 0,1 М после каждого цикла хроматографии, между циклами сорбент консервировали в 20% растворе этанола. Состав буферных растворов, использованных в хроматографии, а также исходные концентрации веществ были выбраны в соответствии с рекомендациями производителя сорбента. Концентрацию рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 в элюате рассчитывали с помощью значения абсорбции, полученного на спектрофотометре при длине волны 280 нм, коэффициента экстинкции ($41370 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) и молекулярной массы 26 056,3 Да. Чистоту фракций определяли путем денситометрического анализа изображений окрашенных полиакриламидных гелей с помощью программного инструмента ImageJ 1.49f [13].

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН) по Лэммли и подготовку проб [14], фиксацию и окрашивание ПААГ раствором Кумасси бриллиантового синего R-250 [15], исследование растворимости рекомбинантного белка [16] проводили в соответствии с общепринятыми экспериментальными протоколами.

Для проведения иммуноферментного анализа рекомбинантный антиген ЦВС-2 иммобилизовали на поверхности 96-луночного полистиролового планшета (ОАО «Медполимер»). Для этого высокоочищенные фракции белка капсида ($\geq 95\%$) разводили до концентрации 20 мкг/мл фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ) (2 мМ KH_2PO_4 , 10 мМ Na_2HPO_4 , 137 мМ NaCl , 2 мМ KCl pH 7,4) и вносили в объеме 50 мкл в лунки планшета. Иммобилизацию антигена, блокирование поверхности планшета, а также все этапы инкубации во время иммунологических реакций проводили при температуре 37°C со встряхиванием средней интенсивности в течение 1 часа. Блокирование свободных сайтов связывания белка на поверхности лунок планшета осуществляли путем инкубации в них

300 мкл фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,05% Tween-20. На каждом этапе ИФА объем добавляемого в лунку реактива составлял 50 мкл. Между этапами инкубации реагентов лунки планшета промывали 4 раза ФСБ. Образцы контрольных сывороток в соответствии с инструкцией производителя добавляли неразведенными, вторичные козы антитела к свиному IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abscam plc.) добавляли в концентрации 0,2 мкг/мл. Для проявления иммунных комплексов в лунки вносили субстратную смесь (0,1 мг/мл ТМБ, 0,01% перекись водорода, 0,1 М ацетат-цитратный буферный раствор pH 6,0), после чего планшет инкубировали при комнатной температуре до максимального проявления окраски, но не более 15 мин. Затем реакция останавливалась добавлением эквивалентного объема стоп-раствора (1 М серная кислота). Результаты фиксировались путем считывания оптической плотности на планшетном фотокolorиметре при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

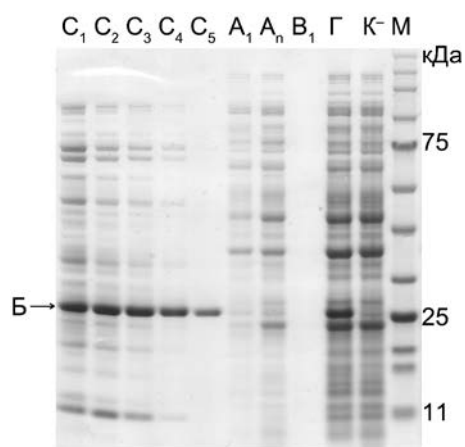
Для титрования компонентов ИФА при оптимизации методики использовали свиную поликлональную антисыворотку к ЦВС-2 (Accurate Chemical & Scientific corporation, лот J1322) в диапазоне разведений 200–12800, рекомбинантный белок капсида при иммобилизации в диапазоне концентраций 0,08–80 мкг/мл, вторичные антитела к свиному IgG меченые пероксидазой хрена (Abscam plc.) в диапазоне концентраций 0,0125–0,8 мкг/мл.

Результаты и обсуждение

Ранее мы разработали несколько вариантов рекомбинантного белка капсида [17]. Все они обладают двумя важными свойствами – во-первых, накапливаются в растворимой форме в клетках продуцента, во-вторых, имеют высокие расчетные изоэлектрические точки ($pI > 9,8$), тогда как изоэлектрические точки большинства эндогенных клеточных белков продуцента *E. coli* находятся в диапазоне 4–7 [18, 19]. Это легло в основу предварительных экспериментов по очистке рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 с помощью катион-обменной хроматографии. Однако, несмотря на варьирование градиентов pH и концентрации хлорида натрия на этапах связывания и элюции, получаемые фракции белка содержали значительный процент примесей ($\geq 50\%$) [20], большая часть которых, вероятно, представлена рибосомными белками с высокими изоэлектрическими точками [21]. Такая процедура очистки может быть вполне эффективна в качестве одного из этапов многостадийной очистки, но она не пригодна для поставленных задач исследования. Поэтому мы создали конструкцию в составе вектора pET-24b для экспрессии открытой рамки считывания (ОРС), кодирующей рекомбинантный укороченный белок капсида ЦВС-2 с полигистидиновой меткой на С-конце. Данная конструкция, обозначенная как pTH, позволяет использовать для очистки продуцируемого белка метод металл-хелатной хроматографии, и была получена путем удаления стоп-кодона из описанной ранее конструкции pET-TR [17], в результате чего в транслируемую последовательность оказалась включена группа из 6 гистидиновых кодонов.

Меченый рекомбинантный белок, размером 26 кДа, как и другие версии белка капсида ЦВС-2, накапливается в растворимой форме. По данным денситометрического анализа его доля составляет 18–20% от общего белка клетки. Поэтому для хроматографии использовали непосредственно гомогенат клеток продуцента в буфере А, осветленный центрифугированием. Объем пробы для нанесения на колонку рассчитали таким образом, чтобы количество связываемого белка не превышало 10 мг, что соответствует половине динамической емкости 1 мл сорбента, заявленной производителем (при скорости потока 1 мл/мин). Помимо этого, осветленный гомогенат разводили буфером А до концентрации белка ≤ 5 мг/мл, чтобы понизить вязкость раствора, а также исключить превышение его буферной емкости, поскольку для эффективного связывания меченого белка с сорбентом необходимо определенное значение pH ($\geq 7,2$), гарантирующее полное депротонирование остатков гистидина метки [22]. Хроматографию проводили самотеком со скоростью 0,8–0,9 мл/мин, на каждом этапе собирали фракции объемом 0,5–1 мл. После нанесения гомогената, для удаления не связавшихся с сорбентом белков, колонку промывали 5

объемами буферного раствора А. Далее сорбент промывали буферным раствором В, пока уровень сигнала на спектрофотометре ($\lambda=280$ нм) не достиг значения холостой пробы. После этого производили элюцию буферным раствором С. Результаты анализа собранных фракций хроматографии приведены на рисунке 1.



Б – рекомбинантный белок капсида ЦВС-2; C₁–C₅ – фракции элюции в порядке их получения; A₁–A_n – первая и последняя фракции загрузки пробы, соответственно; B₁ – первая фракция промывки буферным раствором В; Г – грубый гомогенат клеток продуцента; K⁻ – отрицательный контроль, индуцированные ИПТГ клетки продуцента с «пустым» вектором pET-24b; М – маркеры молекулярного веса белков *CSL-BBL Blue Wide Range Protein Ladder* (Cleaver Scientific Ltd)

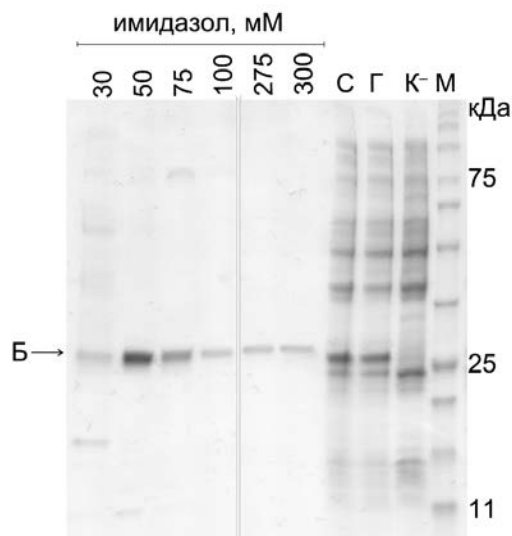
Рисунок 1 – ДСН-ПААГ электрофорез фракций, собранных в процессе адсорбционной никель-хелатной хроматографии

Всего на колонку загрузили 4,6 мг белка капсида ЦВС-2 в составе 25 мг общего белка, концентрация которого составила 0,5 мг/мл. В результате хроматографии в совокупности было получено около 1 мг рекомбинантного белка капсида в пяти фракциях с чистотой от 30 до $\geq 95\%$, из них 0,1 мг белка приходилось на высокоочищенные фракции ($\geq 95\%$). При объединении всех проб элюции возможно получить препарат целевого белка с промежуточной степенью чистоты 59%. Очевидно, что при данных условиях хроматографии сорбент способен связать не более 25% рекомбинантного белка и часть его, по-видимому, оказывается в «проскоке». Поскольку в результате элюции суммарно было получено 3 мг белка, маловероятно, что была превышена динамическая емкость сорбента (20 мг/мл для меченого eGFP). Кроме того, существует возможность конкурентного вытеснения белковых примесей меченым белком при его достаточной концентрации, поэтому в дальнейших экспериментах мы увеличили количество наносимого на колонку рекомбинантного белка.

Количество примесей, удаляемых при концентрации имидазола 20 мМ в буферном растворе В, весьма незначительно, поскольку во всех фракциях, собранных на этапе промывки сорбента, отсутствуют белки, детектируемые используемым методом окрашивания.

Для исследования эффективности связывания рекомбинантного белка капсида с используемым сорбентом эксперимент повторялся в условиях ступенчатого повышения концентрации имидазола на этапе элюции с 50 мМ до 300 мМ с шагом 25 мМ. После каждой ступени элюции колонка промывалась буферным раствором с соответствующей концентрацией имидазола до базовой линии абсорбции света (280 нм) в измеряемой фракции (12–15 объемов). Однако при этом на колонку загружалось 30 мг белка капсида (концентрация общего белка 5 мг/мл), чтобы, по возможности, концентрация белка во фракциях элюции достигла нижнего предела диапазона чувствительности метода окрашивания. На рисунке 2 показаны результаты ДСН-ПААГ электрофореза нескольких первых и последних фракций элюции.

Каждый шаг повышения концентрации имидазола приводил к элюции 0,26–1,04 мг рекомбинантного белка капсида. Наибольшее количество белка элюировалось уже при концентрации 50 мМ (1,04 мг), в дальнейшем на каждом этапе получали приблизительно одинаковые количества белка (в среднем 0,43 мг на шаг).

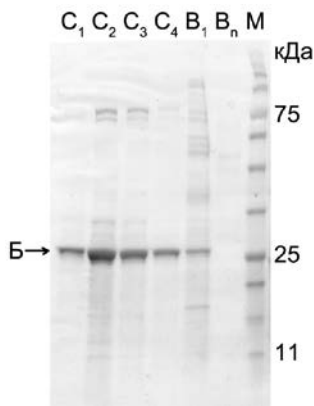


Б – рекомбинантный белок капсида ЦВС-2; С – супернатант, полученный после центрифугирования грубого гомогената; Г – грубый гомогенат клеток продуцента; К – отрицательный контроль, индуцированные ИПТГ клетки продуцента с «пустым» вектором рЕТ-24b; М – маркеры молекулярного веса белков *CSL-BBL Blue Wide Range Protein Ladder* (Cleaver Scientific Ltd)

Рисунок 2 – Влияние концентрации имидазола на эффективность элюции рекомбинантного белка капсида

Вероятно, существует несколько конформационных состояний связывания, отличающихся количеством задействованных гистидиновых остатков и, соответственно, силой адсорбции, выражающейся в концентрации имидазола, необходимой для конкурентного вытеснения данной фракции белка [23]. В последней группе фракций элюции с концентрацией имидазола 500 мМ количество очищенного белка оказалось незначительным.

Из приведенных результатов можно сделать вывод, что рекомбинантный белок капсида способен связываться с сорбентом HisPur в широком диапазоне концентраций имидазола, тогда как в примесных белках задействованы в основном слабые связи [24], поэтому значительная часть примесей смывается уже при низких концентрациях имидазола. Для получения препарата более высокой степени очистки мы решили увеличить концентрацию имидазола в промывочном буфере В до 40 мМ, а для элюции белка использовать первоначальную концентрацию 300 мМ. Такая схема очистки привела к результатам, представленным на рисунке 3. Повторив предыдущий эксперимент при новых условиях получили 3,5 мг белка капсида в составе четырех фракций с чистотой 58–95%, совокупная степень очистки препарата при объединении фракций составит 74% при концентрации 0,58 мг/мл. Высокоочищенного белка (≥95%) получили 0,6 мг. На этапе промывки в составе примесей из-за высокой концентрации имидазола было потеряно около 0,8 мг белка, таким образом, повышение чистоты препарата сопровождается уменьшением выхода очищенного белка.



Б – рекомбинантный белок капсида ЦВС-2; С₁–С₄ – фракции элюции в порядке их получения; В₁–В_n – первая и последняя фракции промывки буферным раствором В; М – маркеры молекулярного веса белков *CSL-BBL Blue Wide Range Protein Ladder* (Cleaver Scientific Ltd)

Рисунок 3 – Результаты никель-хелатной хроматографии после повышения концентрации имидазола на этапе промывания

Антигенные свойства рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 могут существенно различаться в зависимости от используемой системы экспрессии, штамма вируса-источника белка, конструктивных особенностей ОРС, которые выражаются в наличии меток или отсутствии отдельных фрагментов или даже целых доменов в структуре кодируемого белка. Результатом экспрессии созданной нами конструкции является белковый продукт, в котором отсутствует небольшой N-концевой фрагмент (32 аминокислотных остатка) белка капсида, не несущий иммуногенной нагрузки [25], но оказывающий существенное негативное влияние на уровень экспрессии ОРТ [17]. Кроме того, С-конец белка, который, хотя и не участвует в формировании каких-либо эпитопов, но располагается в непосредственной близости от них [26], содержит гистидиновую метку. Сложно напрямую оценить антител-связывающую активность антигена с такой организацией путем сравнения, к примеру, с коммерческими аналогами, поскольку в настоящий момент на рынке таковые отсутствуют. Однако возможно провести косвенное сравнение по эффективности иммунизации, оцениваемой с помощью коммерческого набора, в основе которого также используется рекомбинантный антиген ЦВС-2. С этой целью десять здоровых поросят (с отсутствующим иммунитетом к ЦВС-2 по результатам ИФА) 21 дневного возраста иммунизировались рекомбинантным белком капсида ЦВС-2 в составе клеток продуцента по методике иммунизации сложными антигенами [27]. Для этого им на каждые 5 кг веса вводили по 1 мл суспензии нежизнеспособных клеток продуцента (концентрация 10^8 кл/мл), обработанных теотропином, в смеси с кремофором (15%) в качестве адъюванта, рекомбинантным свиным α -интерфероном (5 мкг/мл), витамином Е (5%) и витамином С (15%) в качестве вспомогательных добавок. Теотропин добавляли в питательную среду до концентрации 0,2% по окончании периода наработки рекомбинантного антигена продуцентом, после чего продолжали инкубацию в течение 3 часов. Непосредственно перед иммунизацией и через 25 дней после нее собирали пробы сывороток и проверяли их с помощью набора реагентов «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (ООО Ветбиохим). У 6 из 10 особей выявили средний уровень антител к ЦВС-2, процент связывания конъюгата в положительных пробах (по отношению к положительной контрольной сыворотке) находился в диапазоне 34–56% (область положительных значений по инструкции $>20\%$). Поскольку методом ПЦР со специфическими праймерами [28] выявить геном ЦВС-2 в образцах не удалось, а иммунитет к ЦВС-2 перед введением антигена отсутствовал, наиболее вероятной причиной иммунизации послужил введенный в составе комплексного антигена рекомбинантный белок капсида ЦВС-2. Поэтому можно сделать вывод о наличии некоторых общих идентичных или близких антигенных детерминант между коммерческим и исследуемым рекомбинантными антигенами ЦВС-2, обуславливающих существование перекрестно реагирующих антител.

При иммунизации поросят количество антигена было целенаправленно занижено, чтобы избежать возможных отрицательных последствий введения цельных клеток грамотрицательных бактерий. Вероятнее всего, использование более высоких концентраций иммуногена (до 2^{10} кл/мл на килограмм веса) [27] повысит долю успешно иммунизированных особей.

Для исследования возможности использования полученного рекомбинантного антигена в иммуноферментном анализе фракции белка высокой степени очистки ($\geq 95\%$) объединяли и разводили фосфатно-солевым буферным раствором до конечной концентрации антигена 80 мкг/мл, после чего использовали в экспериментах по титрованию для определения оптимальных концентраций компонентов реакции в иммуноферментном анализе. Результаты титрования антигена против разведений коммерческой антисыворотки приведены на рисунке 4 (вторичные антитела к свиному IgG меченые пероксидазой использовались в постоянной концентрации 0,4 мкг/мл). Аналогичным образом антиген титровался против разведений вторичных антител (0,0125–0,8 мкг/мл) при постоянном (оптимальном) разведении антисыворотки 1/800 (при рекомендованном производителем разведении 1/400).

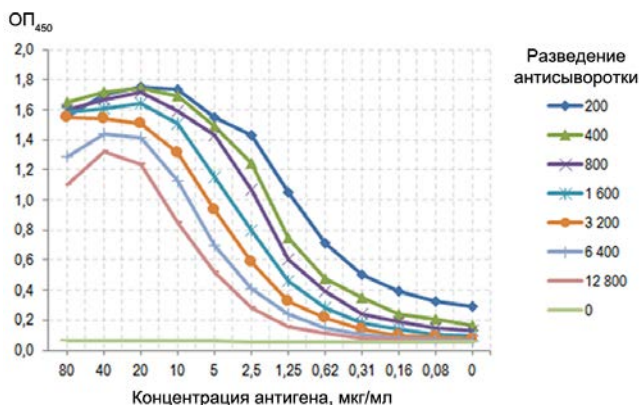


Рисунок 4 – Кривые титрования концентрации антигена против разведения антисыворотки при оптимизации метода ИФА

Основываясь на данных кривых титрования в дальнейшей работе при иммобилизации антигена использовали раствор очищенного белка капсида ЦВС-2 с концентрацией 20 мкг/мл, и разведение вторичных антител в концентрации 0,2 мкг/мл. С помощью разработанной схемы анализа были проверены доступные коммерческие сыворотки: положительная контрольная сыворотка фирмы Accurate Chemical&Scientific corporation (лот J1323), положительная контрольная сыворотка фирмы ООО «Ветбиохим» из набора реагентов «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (серия 04, контроль 04), отрицательная контрольная сыворотка фирмы ООО «Ветбиохим» из набора реагентов «ЦИРКО-СЕРОТЕСТ» (серия 04, контроль 04). Коэффициенты вариации рассчитывали по контрольной сыворотке фирмы Accurate Chemical&Scientific corporation. Коэффициент внутрисерийной вариации (в пределах одного планшета) составил 3,1% ($n=24$). Коэффициент межсерийной вариации (между планшетами) составил 6,5% ($n=8$). Отношение среднего значения в лунках с положительным контролем к среднему значению в лунках с отрицательным контролем составило >40 при средней интенсивности сигнала $1,9 \pm 0,01$ ($\bar{x} \pm SE$, $n=24$) оптических единиц (OP_{450}).

Выводы

Таким образом, использованная технология очистки рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 методом металл-хелатной адсорбционной хроматографии позволяет в одну стадию получить препарат антигена высокой степени очистки. Тем не менее, значительное количество белка, сосредоточенное во фракциях с низкой и промежуточной степенью очистки, остается недоступным для использования в иммуноферментном анализе, поскольку большинство особей иммунизируются различными антигенами *E. coli* в условиях ферм естественным путем и, соответственно, присутствие посторонних белков продуцента в твердой фазе понижает специфичность анализа, увеличивая риск получения ложноположительного результата. Отдельного исследования требует вопрос об использовании дополнительной стадии предочистки, которая, хотя и увеличит потери целевого белка, трудоемкость и стоимость процесса очистки, но, вероятнее всего, окажется экономически выгодной. Несмотря на то, что эксперимент по иммунизации свиней комплексным антигеном был направлен на изучение свойств рекомбинантного антигена, он позволил выявить потенциал препарата в качестве основы для вакцины против вызываемых ЦВС-2 инфекций.

При отсутствии коммерческих рекомбинантных антигенов и панелей контрольных сывороток к ЦВС-2 дальнейшее всестороннее изучение разработанной схемы иммуноферментного анализа будет проводиться с использованием образцов сывороток свиней, проверенных диагностическими ветеринарными лабораториями или любым доступным референсным методом обнаружения ЦВС-2, и направлено оно будет, главным

образом, на установление областей положительных и отрицательных значений, определение специфичности и чувствительности метода.

Список литературы

1. Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome / J. Ellis [et al.] // *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne.* – 1998. – Vol. 39, № 1. – P. 44–51.
2. Segalés, J. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis / J. Segalés // *Virus research.* – 2012. – Vol. 164, № 1-2. – P. 10–19.
3. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe / G.M. Allan [et al.] // *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* – 1998. – Vol. 10, № 1. – P. 3–10.
4. Development and validation of an ELISA using a protein encoded by ORF2 antigenic domain of porcine circovirus type 2 / S.-Q. Sun [et al.] // *Virology journal.* – 2010. – Vol. 7, – P. 274.
5. Modified indirect porcine circovirus (PCV) type 2-based and recombinant capsid protein (ORF2)-based enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to PCV / P. Nawagitgul [et al.] // *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* – 2002. – Vol. 9, № 1. – P. 33–40.
6. Molecular biology of Porcine circovirus: analyses of gene expression and viral replication / A. Mankertz [et al.] // *Veterinary Microbiology.* – 2004. – Vol. 98, № 2. – P. 81–88.
7. Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein / P. Nawagitgul [et al.] // *The Journal of general virology.* – 2000. – Vol. 81, № Pt 9. – P. 2281–2287.
8. Comparison of three enzyme-linked immunosorbent assays to detect Porcine circovirus-2 (PCV-2)-specific antibodies after vaccination or inoculation of pigs with distinct PCV-1 or PCV-2 isolates / A.R. Patterson [et al.] // *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc.* – 2008. – Vol. 20, № 6. – P. 744–751.
9. Blanchard, P. An ORF2 protein-based ELISA for porcine circovirus type 2 antibodies in post-weaning multisystemic wasting syndrome / P. Blanchard // *Veterinary Microbiology.* – 2003. – Vol. 94, № 3. – P. 183–194.
10. Studier, F.W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures / F.W. Studier // *Protein Expression and Purification.* – 2005. – Vol. 41, № 1. – P. 207–234.
11. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Analytical biochemistry.* – 1976. – Vol. 72, – P. 248–254.
12. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server / M.R. Wilkins [et al.] // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* – 1999. – Vol. 112, – P. 531–552.
13. Schneider, C.A NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis / C. A Schneider, W.S. Rasband, K.W. Eliceiri // *Nature Methods.* – 2012. – Vol. 9, № 7. – P. 671–675.
14. Gallagher, S.R. One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins / S.R. Gallagher // *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]. – 2012. – Ch. 10. – U. 10.2a.
15. Sasse, J. Staining proteins in gels / J. Sasse, S.R. Gallagher // *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]. – 2009. – Ch. 10. – U. 10.6.
16. Bernard, A. Selection of Escherichia coli expression systems / A. Bernard, M. Payton // *Current protocols in protein science* / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]. – 2001. – Ch. 5. – U. 5.2.
17. Прокулевич, В.А. Экспрессия открытой рамки трансляции белка капсида ЦВС-2 в клетках E.coli / В.А. Прокулевич, К.В. Кудин // *Микробные биотехнологии.* – 2013. – Т. 5. – P. 131–141.

18. Link, A J. Comparing the predicted and observed properties of proteins encoded in the genome of *Escherichia coli* K-12 / A J. Link, K. Robison, G.M. Church // *Electrophoresis*. – 1997. – Vol. 18, № 8. – P. 1259–1313.
19. O’Farrell, P.Z. High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins / P.Z. O’Farrell, H.M. Goodman, P.H. O’Farrell // *Cell*. – 1977. – Vol. 12, № 4. – P. 1133–1141.
20. Кудин, К.В. Разработка метода очистки рекомбинантного белка капсида ЦВС-2 / К.В. Кудин, В.А. Прокулевич, Ю.О. Прокопкина // Сборник тезисов 18-ой Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых “Биология - наука XXI века.”– 2014. – P. 26–27.
21. Kaltschmidt, E. Ribosomal proteins. XIV / E. Kaltschmidt // *Analytical Biochemistry*. – 1971. – Vol. 43, № 1. – P. 25–31.
22. Johnson, R.D. Multipoint binding in metal-affinity chromatography II. Effect of pH and imidazole on chromatographic retention of engineered histidine-containing cytochromes c / R.D. Johnson, R.J. Todd, F.H. Arnold // *Journal of chromatography. A*. – 1996. – Vol. 725, № 2. – P. 225–235.
23. Knecht, S. Oligohis-tags: mechanisms of binding to Ni²⁺-NTA surfaces / S. Knecht [et al.] // *Journal of molecular recognition : JMR*. – 2009. – Vol. 22, № 4. – P. 270–279.
24. Bolanos-Garcia, V.M. Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography / V.M. Bolanos-Garcia, O.R. Davies // *Biochimica et biophysica acta*. – 2006. – Vol. 1760, № 9. – P. 1304–1313.
25. Mahé, D. Differential recognition of ORF2 protein from type 1 and type 2 porcine circoviruses and identification of immunorelevant epitopes / D. Mahé [et al.] // *The Journal of general virology*. – 2000. – Vol. 81, № Pt 7. – P. 1815–1824.
26. Khayat, R. The 2.3-angstrom structure of porcine circovirus 2 / R. Khayat [et al.] // *Journal of virology*. – 2011. – Vol. 85, № 15. – P. 7856–7862.
27. Fuller, S.A. Immunization of mice / S.A. Fuller, M. Takahashi, J.G. Hurrell // *Current protocols in molecular biology* / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]. – 2001. –Ch. 11. – U. 11.4.
28. Кудин, К.В. Клонирование гена белка капсида белорусского штамма цирковируса свиней 2 типа / К.В. Кудин, В.А. Прокулевич // *Вестник БГУ*. – 2011. – Vol. 2, № 2. – P. 37–41.